

氏 名	MD. IQBAL FARUK
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第3623号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	A screen for host factors involved in hypovirus symptom induction in the chestnut blight fungus, <i>Cryphonectria parasitica</i> (ハイポウイルスの病徴発現に関与するクリ胴枯病菌宿主因子の探索)
論文審査委員	教授 鈴木 信弘      教授 積木 久明      准教授 且原 真木

### 学位論文内容の要旨

The prototype hypovirus, CHV1-EP713, causes virulence attenuation and severe suppression of asexual sporulation and pigmentation in its host, the chestnut blight fungus, *C. parasitica*. We here describe the development of a genetic screening protocol where a collection of fungal strains carrying artificially induced mutations is mined for host factors involved in hypovirus symptom expression. The method involved: 1) the integration of the full-length cDNA to the genomic RNA of a hypovirus single amino acid substitution mutant, Cys(72), into the genome of a field fungal isolate EP155 allowing the launch of the virus infection in theoretically every cell; 2) insertional mutagenesis of the resulting transformant (TCys72-1) by plasmid pHygR; 3) isolation of mutants of interests; and 4) identification of causative mutated genes by inverse-PCR. An isolated mutant, *namA*, showed an irregular fungal morphology with mycelial protrusions, reduced conidiation, and repressed pigmentation, while retaining similar levels of virulence, compared to the parental strain TCys(72)-1 or Cys(72)-infected EP155. However, virus-cured *namA* (VC-*namA*) was indistinguishable from EP155 and virus-cured TCys(72)-1, VC-TCys(72)-1 in colony morphology. The phenotypic difference between VC-*namA* and VC-TCys(72)-1 was found only when infected with the wild type or mutant CHV1-EP713 strains, but not when infected with *Mycoreovirus 1*. Sequence analysis of inverse PCR-amplified genomic DNA fragments and cDNA identified the insertion site of the mutagenic plasmid in exon 8 of the *nam-1* gene. NAM-1 comprising 1257 amino acids shows sequence similarities to counterparts from other filamentous fungi, and possesses the CorA domain that is conserved in a class of Mg<sup>2+</sup> transporters from prokaryotes and eukaryotes. Complementation assay using the wild type and the mutant alleles, and targeted disruption of *nam-1* showed *nam-1* with an extension of the pHygR-derived sequence contributed to the altered phenotype in the *namA* mutant. The molecular mechanism underlying virus-specific fungal symptom modulation in VC-*namA* is discussed.

This study provides a solid base for future extensive screening for host factors associated with mycovirus symptom induction in chestnut blight fungus, which allows to accelerate revelation of unrecognized gene functions and contributes to progress in studies on mycovirus/host interactions.

## 論文審査結果の要旨

ハイポウイルスは世界3大樹病の一つであるクリ胴枯病の病原糸状菌 *Cryphonectria parasitica* に感染し、宿主菌の生育、病原性、色素形成、胞子形成を低下させる。Faruk氏は、ハイポウイルス／クリ胴枯病菌系の病徴発現に関与する宿主因子の探索を進め、以下の成果を得た。

ハイポウイルスの代表種CHV1-EP713のマイルド系統、Cys (72) のcDNAをクリ胴枯病菌、EP155系統に形質転換した。この系統の染色体に薬剤（ハイグロマイシン）耐性遺伝子をもつプラスミド（pHygR）をランダム挿入することで変異株集団を得た。コロニーの肉眼観察によりTCys72-1（親株）とは異なる症状を示した変異株十数株を選抜し、pHygR1コピーが挿入された変異株 *namA* をさらなる解析に回した。

ウイルス除去処理を施した *namA*（VC-*namA*）に各種ハイポウイルス系統、別種のマイコレオウイルスを接種し、病徴を観察した。その結果、VC-*namA* はウイルスフリーの非形質転換体EP155と同じ表現型を示したが、ハイポウイルス感染に特異的に異常な病徴（通常の病徴に比べ色素形成、胞子形成のさらなる低下、波形のコロニー形態）を示した。しかし、マイコレオウイルスによる異常な病徴は観察されなかった。病因遺伝子の同定は、まずインヴェースPCRによるプラスミド挿入部位の同定、配列決定、次に野生型遺伝子による相補試験、破壊試験を組み合わせることで行った。pHygRが導入された近傍約8.5kb、その領域からの転写物の配列を決定し、Mg<sup>2+</sup>輸送体CorAファミリーのメンバーをコードする遺伝子 *nam-1* の第8エクソンにpHygR挿入を認めた。*nam-1* 変異アリル、野生型アリルを用いた相補試験、さらには *nam-1* 破壊試験を行い、挿入変異が *namA* の異常な病徴に関与することを確認した。

これらの結果は、1) ハイポウイルスの病徴発現に関与する宿主因子を同定するための手法が確立された、2) NAM-1蛋白質がCHV1による病徴発現を低減する、3) VC-*namA* が感染特異的しかもウイルス系統特異的に病徴発現の異状を呈する、ことを示す。

Faruk氏は博士号に値する上記のような十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。